

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Polyester auf der Basis von 4-Hydroxyalkansäuren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Insbesondere betrifft die Erfindung Polyester auf der Basis von C₆-bis C₁₄-4-Hydroxyalkansäuren, besonders bevorzugt Polyester auf der Basis von 4-Hydroxybuttersäure.

Es ist bekannt, daß bestimmte Bakterien in der Lage sind, Polyester aus 3-Hydroxybuttersäure-Racematsatz zu synthetisieren. Derartige Polyester lassen sich als Granula weiterverarbeiten. Diese Polyester liegen grundsätzlich als Polymere der O(-)-β-Hydroxybuttersäure vor (Dawes, E. A. und P. J. Senior, Arch. Microbiol. Physiol. 14, 263, 1973).

Die bisher bekannten, über mikrobiologische Verfahren erhaltenen, biologisch abbaubaren Polyester aus gesättigten, aliphatischen Hydroxy-carboxy-komponenten (Alkanamiden) weichen mit Hilfe von Alkaligenes europaea herstellbar sind, bestehen aus Copolymerisaten, die entweder aus 3-Hydroxybuttersäure (3HB) und 4-Hydroxybuttersäure (4HB) aus zufällig variierendem Anteil davon bestehen (M. Kunitz et al., App. Microbiol. Bezeichnung, 9010, 369-373, 1969) oder als ein zufälliges Gemisch aus zwei verschiedenen 3-Hydroxyalkansäuren bestehen (DE-OS 36 11 231, EP-A 7 18 908).

Bisher ist kein Herstellungsverfahren für homomere Polyester aus 4-Hydroxyalkansäuren bekannt.

Reinherbare Polyester finden großes Interesse im Bereich der technischen Verwendung. Aufgrund vielfältiger Anwendung solcher Polyester, die zu nicht toxischen Produkten abgebaut werden, liegt das Interesse an herstellbaren Polymeren mit genau definiertem Struktur.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung Polyester auf der Basis von 4-Hydroxyalkansäuren mit definierter Struktur herzustellen.

Als Lösung dieser Aufgabe wurde gefunden, daß in 4-Säurehydroxylierter, gemischter aliphatischer Monocarbonsäure, vorzugsweise der Kettenlänge C₆ bis C₁₄, insbesondere 4-Hydroxybuttersäure, als Ausgangsstoffe zur Herstellung von sowohl homomeren als auch heteromeren Polyester, die durch einen Gehalt an 4-Hydroxyalkansäuren gekennzeichnet sind, verwendet werden können, wenn die Polymerisationsreaktion aus Hilfe von bestimmten Mikroorganismen und der daraus resultierenden Mutanten erfolgen kann.

Eine derartige Synthese zu solchen Polymeren war nicht bekannt und war auch nicht zu erwarten, weil nach dem bisherigen Stand der Technik zum einen aus aliphatischen Copolyestern erhaltene werden konnten, die bei Verwendung von 4HB als Kohlenstoffquelle einen variablen Anteil von 0 bis 33 mol-% 4HB enthalten (M. Kunitz et al., loc. cit.) und zum anderen nur die Densitometrie zur polyl-HB beizugehen. Die mikrobielle Herstellung von homomeren Polymeren und Polymeren mit 2-40 mol-% an 4-Hydroxyalkansäuren aus 4-Hydroxyalkansäuren mußte daher als neu durchführbar betrachtet werden.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß mit Mikroorganismen, von denen bekannt ist, daß sie 3HB verwerten und in Form von Polyl(HB) akkumulieren (E. A. Dawes, E. A. und P. J. Senior, 1973 loc. cit.) oder die auch 4HB verwerten können und bekannterweise nur solche

Copolymeren erzeugen, die innerhalb eines begrenzten Bereichs aus einem zufälligen Anteil von Polyl(HB) bestehen (2-37 mol-%), die erfindungsgemäßen Polyester aus entsprechenden 4-Hydroxyalkansäuren, insbesondere der Kettenlänge C₆ bis C₁₄, vorzugsweise 4-Hydroxybuttersäure, hergestellt werden können, wenn diese Mikroorganismen auf Wachstumsmedien eine entsprechende 4-Hydroxyalkansäure angeboten wird. Wenn derartige Mikroorganismen einem Mutationsverfahren unterzogen werden, können Mutantenstämme, die solche Polyester erzeugen können, isoliert werden.

Somit sind auch die Mikroorganismen, die zur Synthese (oder Polyl(HB)-akkumulation) aus den entsprechenden 4-Hydroxyalkansäuren befähigt sind, Gegenstand der vorliegenden Erfindung. In auch siehe, die durch Erfindung dieser Mikroorganismen erhalten werden können.

Gemäß vorliegender Erfindung kann die Herstellung der erfindungsgemäßen Polyester, durch ein Verfahren erfolgen, welches die folgende Schritte umfaßt:

1. Anreicherung und Selektierung einer Reaktion eines Mikroorganismus oder die Herstellung eines Reaktions einer Mutante davon, welche zur Synthese eines aus 4-Hydroxyalkansäuren vorzugsweise der Kettenlänge C₆ bis C₁₄, insbesondere aus 4-Hydroxybuttersäure, bestehenden Polymeren befähigt sind;
2. Züchtung der Reinkulturen dieser Mikroorganismen, entweder in Batch- oder Batchverfahren (Handbuch der Biotechnologie, Franz P. Jassé, U. S. S. W. Sakovich, D. Verlag Chemie, 2. Auflage 1984) im Zuckerversäuerungs- oder im komprimierten Verfahren, in einem Kulturreaktor, welches eine der genannten 4-Hydroxyalkansäuren, die gegebenenfalls als So₂-begehrte als Nitrat- oder Kaliumsalz, vorliegen kann, enthält, derart, daß eine Anreicherung der entsprechenden Polyl(4-Hydroxyalkansäure) erfolgt;
3. Isolierung des polylischen Polymeren aus dem Zell- oder erfindungsgemäßen Mikroorganismen.

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen Polyester eignen sich alle diejenigen Mikroorganismen, insbesondere Bacterium, oder die davon aufgrund bekannter Mutation- und Auswahlvorgänge (Allgemeine Mikrobiologie, J. G. Schlegel, 1. Auflage, Verlag 1985) erhaltene Mutantenstämme, die in der Lage sind, aus 4-Hydroxyalkansäuren die entsprechenden Polyester zu synthetisieren. Diejenigen Mikroorganismen, von denen bekannt ist, daß sie zur Synthese und Akkumulation von Polyl(HB) befähigt sind (Dawes, E. A. und P. J. Senior, 1973 loc. cit.) sind ganz bevorzugt. Insbesondere sind solche Mikroorganismen und deren fermentative Mutanten bevorzugt, die von den Gattungen Alcaligenes, Pseudomonas, Acetobacter, Novella, Arsenomyces, Bacillus, Arsenobacter, Agrobacterium, Rhodospirillum, Paracoccus herkommen. Diese Mikroorganismen, von denen die Gattung Alcaligenes und Pseudomonas ganz bevorzugt Ausgangspunkte für die Herstellung der erfindungsgemäßen Polyester sind, sind allgemein bekannt und beschrieben (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, H. R. King, J. O. Holt, Williams & Wilkins, Baltimore/London Edition, 1966).

Zur Anreicherung der Mikroorganismen erfolgt eine

X

5
gewahrt von 50 mM Nier (B. B. Murech bei 30°C
mitzuehrt, danach in ein Mineralnährmedium (wie unter
B angegeben) ohne Ammoniumchlorid mit 0,3% Frac-
tion (abfuhr) (Schubert, P. et al. 1983, loc. cit.) und für
24 Stunden bei 30°C unter aeroben Bedingungen inkubi-
ert. Aus den erhaltenen Zellkulturen wurden die ge-
wünschten Mutanten durch Zellzüchtung in einem Peptid-
nährmedium (2% (w/v) Peptid (Sigma Chemi-
cal Co., St. Louis) in 150 mM NaCl, 0,2 M Zellkulturen-
lösung (pH 7,2) (wie beschrieben) (Schubert, P. et al.
1983, loc. cit.) inkubiert. Die gewachsenen Mutanten wuchsen
eine geringere Dichte auf und tancierten oberhalb der
Wahyp-Zellen. Der Gradient wurde fraktioniert in drei
0,1 ml Portionen auf 100-Fraktionen Platten mit 0,005%
(v/v) NiCl₂ platziert wurden. Die Kolonien der ge-
wünschten Mutanten wuchsen in einigen Spalten (diejenigen
der Wahyp-Zellen). Eine dieser Kolonien, als Mu-
tante SK2813 bezeichnet, wurde für die weitere Auf-
reinigung verwendet.

B Kultivierung (nach Kuhn)

2 ml einer stationären Vorkultur der aus Schritt A
erhaltenen Mutante von SK2813 (50 ml, 30°C, Schüttel-
kultur) in einem Komplettmedium, bestehend aus Beef
exhaust (2 g) und Pepton (1 g) gelöst in einem Liter deion-
isiertem Wasser, wurden in 50 ml eines Mineralnähr-
mediums der Zusammensetzung

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	40 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NH ₄ Cl	0,5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02 g
Fe(EDTA) · 3 H ₂ O	0,001 g

gelöst in einem Liter deionisiertem Wasser, welches 10
ml einer Spurenelementlösung enthält, der Zusammen-
setzung

Triplex B	500 mg
(CSO ₄) ₂ · 7 H ₂ O	200 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	3 mg
H ₂ BO ₃	30 mg
COCl ₂ · 6 H ₂ O	20 mg
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1 mg
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	5 mg

gelöst in einem Liter deionisiertem Wasser, supplemen-
tiert mit 0,3% (w/v) α-Hydroxybuttersäure (Natrium-
salz), sterilisiert und unter aeroben Bedingungen in ei-
nem Schüttelkolben bei 30°C für 48 h kultiviert.

C Charakterisierung des erhaltenen Polymeren

Die aus Schritt B erhaltenen Bakterien wurden über
Zentrifugation geerntet, mit Natriumphosphatpuffer
(pH 7,0) gewaschen, getrocknet und lyophilisiert. Die Zel-
len wurden anschließend einer Methanol-Extraktion nach
Brück, H. et al., Appl. Environ. Microbiol. 34,
1977-1982, (1983) unterworfen. Der Gehalt und die Zu-
sammensetzung des in der Zelle akkumulierten Poly-
mers wurde über Gaschromatographie mit Methyle-
stern von Hydroxyalkansäuren als Referenzsubstanzen

6
System (Brandt, H. et al. 1983, loc. cit.)
Die Analyse des erhaltenen Polymeren ergab einen
Polymergehalt von 18,6 Gew.-% der Trockenzellmasse.
Das Polymer bestand ausschließlich aus Estern von
α-Hydroxybuttersäure (4HB) Monomeren und lag so-
wohl als Homopolymer vor.

Beispiel 2

Es wurde wie unter Beispiel 1 angegeben vorgehen,
außer das anstatt des Mutanten SK2813 der
Wahyp-Stamm A. europaeus (IMP222) verwendet wur-
de.

Die Analyse des von Wahyp-Stamm erhaltenen
Polymeren ergab einen Polymergehalt von 21,3 Gew.-%
der Trockenzellmasse. Das Polymer bestand aus
92,1 mol% 4HB und 7,9 mol% 3-Hydroxybuttersäure
(3HB).

Beispiel 3

Es wurde Beispiel 1 B und C, wiederum außer das
ein Wahyp-Stamm von Pseudomonas sp. anstelle des
Mutanten SK2813 verwendet wurde.

Die Analyse des von dieser Pseudomonas-Mutante
erhaltenen Polymeren ergab einen Polymergehalt von
18 Gew.-% der Trockenzellmasse. Das Polymer bestand
ausschließlich aus 4HB und lag sowohl als Homopolymer
vor.

Beispiel 4

Die Kultivierung erfolgte in diesem Fall in einem
Zentrifugationsgefäß unter Verwendung des Wahyp-
Stammes A. europaeus Stamm (IMP222) in einem Schüttel-
kolben (wie unter Beispiel 1 angegeben) für 48 h bei 30°C unter
aeroben Bedingungen kultiviert.

In einem Schritt wurden diese Zellen über Zentrifu-
gation geerntet und in einem Mineralnährmedium (wie
Beispiel 1), jedoch ohne NiCl₂, suspendiert. Das Medi-
um wurde mit α-Hydroxybuttersäure (7%, w/v) supple-
mentiert. Die Zellen, die aufgrund des Fehlens eines
Stickstoffquelle nicht wachsen konnten, wurden bei
30°C für 48 h unter aeroben Bedingungen kultiviert. Die
Bakterien wurden über Zentrifugation geerntet, mit Na-
triumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen, getrocknet und
lyophilisiert. Die Bestimmung des Gehalts und der Zu-
sammensetzung des erhaltenen Polymeren erfolgte wie
unter Beispiel 1 angegeben. Der Gehalt an erhaltenem
Copolymer betrug 42 Gew.-% der Trockenzellmasse.
Das Copolymer bestand aus 78,9 mol% 4HB und
21,1 mol% 3HB.

Beispiel 5

Es wurde Beispiel 1 B und C, wiederum außer das
Aerobacter sp. DSM 1721 anstelle von A. europaeus
(IMP222) (Beispiel 2) verwendet wurde.

Der Gehalt an erhaltenem Copolymer betrug 14,6
Gew.-% der Trockenzellmasse. Das Copolymer bestand
aus 73,5 mol% 4HB und 26,5 mol% 3HB.

Polymerisierungsbedingungen

1. Polymer auf der Basis von α-Hydroxyalkansäu-
ren.
2. Polymer nach Anspruch 1, dadurch gekenn-

X

7
 zeichnen, daß sie thermocardin Polymer sind
 1. Polymer nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
 zeichnet, daß sie einen Gehalt an > 40 mol-% einer
 4-Hydroxybuttersäure enthalten
 4. Polymer nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch ge-
 kennzeichnet, daß die 4-Hydroxybuttersäure Car-
 boxy-4-Hydroxybuttersäure sind
 5. Polymer nach Ansprüchen 1 bis 4, dadurch ge-
 kennzeichnet, daß sie aus 4-Hydroxybuttersäure
 Laktamen bestehen
 6. Verfahren zur Herstellung eines Polymeren nach
 einem der Ansprüche 1 bis 5 unter Verwendung
 von Mikroorganismen
 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekenn-
 zeichnet, daß die Mikroorganismen *Bacillus* spp.
 gewonnen sind
 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekenn-
 zeichnet, daß die Mikroorganismen *Bacillus* spp.
 sind aus den Gattungen *Aerobacter*, *Pseudomonas*,
Aerobacter, *Nocardia*, *Actinomyces*, *Bacillus*,
Actinobacter, *Agaricium*, *Rhodospirillum*, *Para-*
coccus
 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8,
 dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen
 Mutanten sind
 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9,
 dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen
 und die daraus erhaltene Kulturen in Gegenwart
 einer 4-Hydroxybuttersäure angezüchtet, angerei-
 chert oder kultiviert werden und nach der Zellkultur
 der Polymer nach Ansprüchen 1 bis 5 gewonnen
 werden
 11. Polymer, herstellbar nach einem Verfahren ge-
 gemäß Anspruch 6 bis 10
 12. Verwendung eines Mikroorganismus gemäß ei-
 nem der Ansprüche 6 bis 9 zur Herstellung von
 Polymeren nach Ansprüchen 1 bis 5
 13. Mikroorganismen zur Herstellung eines Poly-
 meren nach Ansprüchen 1 bis 5
 14. Mikroorganismen nach Anspruch 13, dadurch
 gekennzeichnet, daß es Bodenmikroorganismen
 sind
 15. Mikroorganismen nach Anspruch 14, dadurch
 gekennzeichnet, daß sie ausgewählt sind aus der
 Gattung *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*,
Nocardia, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Azobacter*,
Agaricium, *Rhodospirillum*, *Paracoccus*
 16. Das Merkmal-System SK 2011 im *Alcaligenes*
eutrophus Stamm [MF722, DLM 5630 hinterlegt
 am 02.11.1989]
 17. Verwendung eines Polymeren nach Ansprüchen
 1 bis 5 in der Chirurgie, Pharmazie, zur Verläpp-
 lung und Mikroverkapselung von Substanzen und
 Verfahren zur Herstellung abbaubarer Verpak-
 lungsmittel, Gegenstände und Formkörper
 18. Formkörper, bestehend aus einem Polymer
 nach Ansprüchen 1 bis 5

—X

- Leersseite -

X

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.